

論文の内容の要旨

論文題目 エストロゲン関連受容体 α 新規転写共役因子 DPF2 の同定と解析

指導教員 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

松山玲子

序論

核内受容体は、標的遺伝子プロモーターの特異的 DNA 配列に結合し転写反応を制御する転写因子であり、脂溶性ビタミンやステロイド化合物、各種代謝中間産物等の脂溶性低分子群をリガンドとして直接結合することで転写制御反応を調節する。核内受容体は遺伝子スーパーファミリーを形成し、現在のところヒトでは 48 種類存在する。大多数の核内受容体はリガンド結合依存的に受容体の構造が変換され、相互作用因子が転写共役抑制因子（コリプレッサー複合体）から転写共役活性化因子（コアクチベーター複合体）へ入れ替わることで、標的遺伝子の転写反応を活性化している。また、転写反応においてクロマチン高次構造を閉じたり緩めたりするクロマチンリモデリング因子の重要性も示されている。しかし、核内受容体遺伝子の中には依然、内在性リガンドが未知の受容体が多数存在し、核内オーファン受容体として分類されている。一般的に核内オーファン受容体は恒常的な転写活性を有していると考えられるが、その転写活性の制御機構には不明な点が多い。理由の一つに核内オーファン受容体の転写活性化機能の検出が困難であることがあげられる。

エストロゲン関連受容体 α (Estrogen-related receptor alpha ; ERR α) は 1988 年、Giguere らがエストロゲン受容体 α の DNA 結合領域をプローブとした cDNA ライブラリ

一のスクリーニングによって同定した最初の核内オーファン受容体である。ERR α の生物学的機能は、脂肪酸酸化、ミトコンドリア生合成、酸化的リン酸化等の細胞内代謝機能の制御のほか、骨の維持や軟骨形成等の骨代謝の制御、乳癌・卵巣癌との関連性等、多様である。

ERR α の内在性リガンドは未だ不明であるが、既知コアクチベーター因子である PGC1 α , β や, SRC-1 等の p160 ファミリーが相互作用し、ERR α 転写活性化機能を促進することが知られている。特に代謝関連の研究では、PGC1 α , β の下流エフェクターとしての ERR α の役割に焦点を当てているものが多い。PGC1 α の mRNA 発現レベルは通常は少量であるが、飢餓やその他代謝ストレスで誘導をうけ、発現が上昇し、ERR α に対し非常に強い転写活性化能を示すため、代謝調節の転写共役因子としての重要性が示唆されている。しかしながら PGC1 α の発現が誘導されない状態、あるいは発現誘導を受けない組織における ERR α の転写活性化機能については不明な点が多い。ERR α が PGC1 α の他にどのような因子と相互作用するのか、ERR α 特異的な転写共役因子は存在するのか、ERR α 転写活性化能制御に関わるヒストン修飾とその相互作用因子についての分子機構について等も不明な点が多い。

そこで、ERR α の転写活性調節機構の解明と生体内機能における解析を目的として、生化学的な精製手法を用いて ERR α 転写共役因子複合体の同定を行った。

結果

生化学的な手法を用いて ERR α 相互作用因子を高精度に精製するために、ERR α を恒常的に発現する細胞株 (Stable cell line) を作成し、浮遊旋回培養により大量に培養し、核抽出液を取得した。その後、抗体カラムによる精製を行い、質量分析計により多数の ERR α 相互作用因子候補を同定した。その一つ、Double PHD finger protein 2 (DPF2) に着目した。DPF2は二つの PHD フィンガー領域を有する全長 391 アミノ酸のタンパク質である。

まず、DPF2 が ERR α と相互作用することを、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞における免疫沈降法および GST プルダウン法にて見出した。

次に酵母の GAL4/UAS 系を用いたルシフェラーゼアッセイ法にて DPF2 が転写共役抑制因子活性を有することを見出した。さらに ERR α に対する DPF2 の転写共役抑制活性を検討した結果 ERR α の転写活性は DPF2 により抑制され、DPF2 が ERR α の転写共役抑制因子であることが見出された。なお、DPF2 はアンドロゲン受容体に対してリガンド依存

的に転写活性抑制能を示したが、エストロゲン受容体 α の転写活性化能は変化させず、DPF2は核内受容体に対して選択的に作用する転写共役抑制因子であった。

次に、DPF2がC末端に二つのPHDフィンガー領域を有することに着目し、DPF2のヒストン修飾認識能をヒストンプルダウン法にて検討した。その結果、DPF2のダブルPHDフィンガー領域はヒストンH3のアセチル化修飾およびトリメチル化修飾を認識することを見出した。なお、インビトロヒストンアセチル化アッセイ法を行ったが、DPF2の免疫沈降産物はヒストンアセチル化活性を有さなかった。また、DPF2はERR α の既知転写共役因子PGC1 α 、CBP/p300、SRC3のいずれに対しても相互作用を示さなかった。

DPF2の相同遺伝子DPF1, 2, 3が神経細胞においてATP依存的クロマチンリモデリング因子複合体(BAF複合体)の新規構成因子であることが報告されたため、DPF2とBAF複合体構成因子との相互作用を検討した結果、DPF2はBAF複合体のコアサブユニット(BAF155, BAF170, BAF250)と相互作用を示した。またGAL4応答配列レポーターを恒常発現する293F細胞を用いて検討した結果、GAL4-DPF2の転写共役抑制活性はHDAC阻害剤トリコスタチンA(TSA)添加により解除されることが見出され、さらにDPF2とHDAC1が相互作用することが免疫沈降法にて示された。

以上より、DPF2はヒストンのアセチル化修飾を認識し、ヒストン脱アセチル化酵素HDAC1をリクルートし、さらにクロマチンリモデリング因子複合体(BAF複合体)を構成することでERR α の転写活性化機能を抑制することが示された。

次にDPF2の生体内機能の解析を行った。近年ERR α の標的遺伝子が多数同定されており、その中から、グルコース輸送体GLUT4、糖新生調節酵素PDK4、細胞内エネルギーセンサーSTK11に着目した。まず、通常状態のC2C12細胞を用いてERR α 標的遺伝子プロモーターにおけるERR α 、DPF2のリクルートをクロマチン免疫沈降法にて検討した。その結果、ERR α 、DPF2は標的遺伝子のプロモーターのERR α 結合配列近傍にリクルートされることを見出した。次に、DPF2のノックダウン条件下でクロマチン免疫沈降法を行い、ERR α 標的遺伝子プロモーターにおいてヒストンアセチル化修飾が増強されることが見出された。したがってDPF2がERR α 標的遺伝子プロモーターにおいてヒストンアセチル化修飾を減弱させる可能性が示唆された。

また、ERR α 標的遺伝子のmRNA発現をリアルタイムPCR法にて検討した。C2C12細胞においてDPF2をノックダウンすると、ERR α 標的遺伝子mRNAの発現が促進された。しかし、DPF2とERR α の両者をノックダウンするとERR α 標的遺伝子の発現変動は

観察されなかった。したがって、DPF2 は代謝関連遺伝子の発現制御において ERR α を介して抑制的に機能すること、その機序はプロモーター領域におけるヒストンアセチル化修飾制御であることが示唆された。

考察

今回の ERR α 恒常発現細胞株の大量培養系の確立と生化学的精製の結果から、今までに報告されていない ERR α 新規転写共役抑制因子 DPF2 の同定に成功した。さらに ERR α の転写共役因子として、DPF2 の他に機能未知の因子が多数存在することが示唆された。ERR α の内在性リガンドは不明であり、恒常的に転写活性化能が ON である可能性も示唆されてきた。しかしながら近年 ERR α 自身のリン酸化や SUMO 化修飾が転写活性制御に作用することが明らかにされ、これらの修飾を制御するシグナル等による ERR α 転写活性化能の ON/OFF 調節機構が存在すると思われる。

今回同定した DPF2 を含む因子は ERR α 活性抑制状態に寄与していると思われる。機序として、DPF2 がヒストンのアセチル化修飾を認識し、HDAC1 をリクルートすることで ERR α 標的遺伝子プロモーターの ERR α 結合配列近傍のヒストンを脱アセチル化し、さらにクロマチンリモデリング因子複合体を構成しクロマチンの構造変換を行うことで ERR α の転写活性に対して抑制能を示すものと思われる。さらに DPF2 RNAi を用いた結果から、DPF2 が筋芽細胞株 C2C12 細胞において熱産生や糖代謝に関わる ERR α 標的遺伝子の発現を制御することを見出した。これらの結果から DPF2 が生体内代謝調節機能に関連することが示唆され、今後の機能解析が期待される。

以上核内オーファン受容体 ERR α と相互作用する転写共役因子として、DPF2 の取得に成功した。この因子はヒストンアセチル化修飾制御などのエピジェネティクス制御を介した転写制御を、主に熱代謝や糖代謝制御関連遺伝子群について行うことが判明し、今後の研究の発展が期待できる因子であった。